

BD

(11)Publication number : 2000-189190

(43)Date of publication of application : 11.07.2000

C12Q 1/02  
G01N 33/50

(71)Applicant : **AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL**

(72)Inventor : **OBA HIDEKI**  
**NAKAMURA OSAMU**  
**SHARAI IMURE**  
**BOKU SEISHU**  
**SUMI TOSHIHISA**

**SOLUTION:** The quantification of apoptosis is carried out as follows: (1) adding an annexin V solution labeled with fluorescent dye of fluorescein isothiocyanate to cells to be tested; (2) incubating them in the presence of calcium ions; (3) measuring the fluorescent intensity of cells at a wavelength in the neighborhood of 535 nm; (4) quantifying apoptosis based on a quantity of increase from fluorescent intensity before inducing the apoptosis of cells to be tested.

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-189190

(P2000-189190A)

(43) 公開日 平成12年7月11日 (2000.7.11)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号 | F I           | テ-マコ-ト* (参考) |
|---------------------------|------|---------------|--------------|
| C 1 2 Q 1/02              |      | C 1 2 Q 1/02  | 2 G 0 4 j    |
| G 0 1 N 33/50             |      | G 0 1 N 33/50 | Z 4 B 0 6 3  |

審査請求 有 請求項の数 1 F D (全 6 頁)

|           |                          |            |  |
|-----------|--------------------------|------------|--|
| (21) 出願番号 | 特願平10-376195             | (71) 出願人   | 000001144<br>工業技術院長<br>東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 |
| (22) 出願日  | 平成10年12月22日 (1998.12.22) | (72) 発明者   | 大庭 英樹<br>佐賀県鳥栖市宿町字野々 F807番地1 九州工業技術研究所内  |
|           |                          | (72) 発明者   | 中村 修<br>佐賀県鳥栖市宿町字野々 F807番地1 九州工業技術研究所内   |
|           |                          | (74) 指定代理人 | 220100014<br>工業技術院九州工業技術研究所長             |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシスの定量方法

(57) 【要約】

【課題】 細胞のアポトーシス、特にアポトーシスの初期過程を簡便に定量する新規な方法を提供する。

【解決手段】 被検細胞にフルオロセインイソチオシアネートで蛍光標識したアネキシンV溶液を加え、カルシウムイオンの存在下でインキュベート処理したのち、該細胞の535nm近傍の波長における蛍光強度を測定し、被検細胞のアポトーシス誘導前の蛍光強度からの増加量に基づいてアポトーシスの定量化を行う。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検細胞にフルオロセインイソチオシアネートで蛍光標識したアネキシンV溶液を加え、カルシウムイオンの存在下でインキュベート処理したのち、該細胞の蛍光強度を測定することを特徴とするアポトーシスの定量方法。

【請求項2】 535nm近傍の波長における蛍光強度を測定する請求項1記載のアポトーシスの定量方法。

【請求項3】 アポトーシスの初期過程を定量する請求項1又は2記載のアポトーシスの定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は細胞のアポトーシス、特にアポトーシスの初期過程を、蛍光標識されたアネキシンV (Annexin V) を用いて簡便に定量する新規な方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生理的な条件下で細胞自らが積極的に惹起するようにプログラムされた細胞死すなわちアポトーシスは、免疫系において老化した細胞や病態細胞などの生体にとって好ましくない細胞を排除するために生体に備わった機構であることが知られている。このアポトーシスは、一般にクロマチン凝縮、細胞容積の減少、エンドヌクレアーゼによるDNAのオリゴヌクレオチドサイズへの断片化などの細胞の形態変化によって特徴付けられる。

【0003】ところで、ガン細胞や悪性腫瘍細胞のような病態細胞の増殖を阻害して、これらの細胞に起因する疾病を治療するものとしては、これまで、アミノプテリン、メトトレキサート、8-アザグアニン、6-メルカプトプリン、5-フルオロウラシル、1-(2-テトラヒドロフリル)-5-フルオロウラシルなどの合成物質、マイトマイシンC、クロモマイシン、プレオマイシンなどの抗生物質、インターフェロン、CSF抑制物質、CBF、TNFなどのバイオテクノロジー製品が知られているが、これらはいずれも所定の細胞に作用して、それを壊死すなわちネクローシスを起こさせて病態細胞を排除するものである。しかしながら、このネクローシスによる細胞死は、往々にして病態細胞のみでなく、周囲の正常細胞にもおよび新たな疾患を惹起するという重大な欠陥がある。これに対し、前記アポトーシスを誘導しうることが可能であれば、白血病などの免疫疾患の治療に際して、生体内での特定の病態細胞のみを排除しうるので、非常に有利である。このように、細胞のアポトーシスの誘導は、ガンなどの細胞に起因する疾病の治療上極めて重要であり、そして、これまでこのようなアポトーシス誘導物質として、例えばアブリン (abrin) などが見出されている。

【0004】このアポトーシスは、その初期過程において、細胞を構成する細胞膜リン脂質の配列変化を伴い、

結果として負電荷のリン脂質であるホスファチジルセリン (phosphatidylserine) の細胞表面への露出が起こる。このようなホスファチジルセリンの細胞表面への発現は、アポトーシス細胞のマクロファージ (macrophage、大食細胞) による認識と排除において、非常に重要な意味をもっている。このようなアポトーシスの初期過程の検出については、従来、アネキシンV標識体を用いて、フローサイトメトリー (flow cytometry) と呼ばれる特殊な検出器により行われている。なお、上記アネキシンVは抗凝血タンパク質であって、カルシウムイオン依存的に前記負電荷のホスファチジルセリンと特異的に結合する性質を有することが知られている。しかしながら、このフローサイトメトリーによる方法は、特殊な技術や経験を必要とし、誰もが簡単に実施しうるものではなく、アポトーシスの初期過程を簡便に定量しうる方法の開発が望まれていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような事情のもとで、細胞のアポトーシス、特にアポトーシスの初期過程を簡便に定量しうる新規な方法を提供することを目的としてなされたものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、細胞のアポトーシスの初期過程を定量しうる簡便な方法について鋭意研究を重ねた結果、被検細胞に特定の物質で蛍光標識したアネキシンV溶液を加え、カルシウムイオンの存在下でインキュベート処理したのち、該細胞の蛍光強度を測定することにより、前記目的を達成しうることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

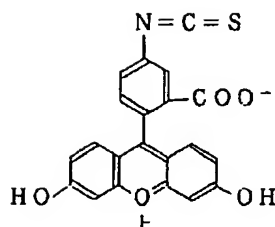
【0007】すなわち、本発明は、被検細胞にフルオロセインイソチオシアネートで蛍光標識したアネキシンV溶液を加え、カルシウムイオンの存在下でインキュベート処理したのち、該細胞の蛍光強度を測定することを特徴とするアポトーシスの定量方法を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明のアポトーシスの定量方法は、アポトーシスの初期過程において、細胞を構成する細胞膜リン脂質の配列変化を伴い、細胞表面に露出する負電荷のリン脂質であるホスファチジルセリンと、抗凝血タンパク質であるアネキシンVとが、カルシウムイオンの存在下に特異的に結合する性質を利用するものである。したがって、本発明方法は、アポトーシスの初期過程の定量に適用するのが有利である。

【0009】本発明においては、アネキシンVとして、フルオロセインイソチオシアネートで蛍光標識したアネキシンV (以下、FITC-アネキシンVと略記する) が用いられる。上記フルオロセインイソチオシアネートは、式

## 【化1】



で表わされる化学構造を有するものであって、従来、抗体の蛍光標識試薬として用いられているものである。このフルオロセインイソチオシアネートは、アルカリ条件下でタンパク質であるアネキシンVのアミノ基と反応して、フルオロセインチオカルバモイル誘導体となり、アネキシンVを蛍光標識化する。

【0010】本発明においては、被検細胞として、アポトーシスが誘導された細胞が用いられるが、このアポトーシスが誘導された細胞としては、例えばアブリンの作用によって、アポトーシスが誘導された白血病株化細胞などを挙げることができる。アブリンは、トウアズキ (*Abrus precatorius*) の種子から分離された強毒性レクチンであって、ほぼ等しい分子量すなわち63000を有し、かつ類似した生理活性を示すアブリンa及びアブリンbと、これらとはセファロース親和性において異なっているもう1種が知られている [「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Biosci, Biotech, Biochem.)」, 第57巻(9), 1409~1413ページ]。

【0011】これらのアブリンの中で、細胞に対するアポトーシス誘導能の点から、アブリンa又はアブリンbが好ましく、特にアブリンaが好適である。このアブリンaを用いて、例えば白血病株化細胞のアポトーシスの誘導を行う場合には、適当な濃度の白血病株化細胞溶液中に、アブリンaを適量添加し、30~40℃程度の温度で30分ないし5時間程度培養することにより、細胞のアポトーシス誘導を行うことができる。

【0012】本発明方法においては、被検細胞に、まず前記FITC-アネキシンV溶液を添加し、カルシウムイオンの存在下でインキュベート処理する。このインキュベート処理は、通常、室温にて1~60分間程度行われる。被検細胞において、アポトーシスが誘導され、細胞膜表面にホスファチジルセリンが露出していれば、上記インキュベート処理によって、FITC-アネキシンVが該ホスファチジルセリンと結合する。したがって、細胞の蛍光強度を測定することにより、アポトーシス、特にアポトーシスの初期過程を定量することができる。上記蛍光強度の測定は、適当な励起波長域の光を照射し、その際発生する535nm近傍の蛍光強度を測定すればよい。前記インキュベート処理において、カルシウムイオンが存在しない場合には、FITC-アネキシン

Vは細胞膜表面のホスファチジルセリンと結合しないため、アポトーシスを定量することができず、本発明の目的が達せられない。

## 【0013】

【発明の効果】本発明方法によれば、細胞のアポトーシス、特にアポトーシスの初期過程を、FITC-アネキシンVを用いて、極めて簡便に定量することができる。

## 【0014】

【実施例】次に、本発明を実施例により、さらに詳細に説明するが、本発明は、これらの例によってなんら限定されるものではない。

## 【0015】実施例

細胞のアポトーシスの誘導は、トウアズキ種子由来の細胞毒性レクチンであるアブリンaを用いて行い、また、細胞はアブリンaによってアポトーシスが誘導されることが明らかとなっている白血病株化細胞のジャーカット (Jurkat)、モルト4 (Molt4) 及びナルム6 (NALM6) を用い、いずれもRPMI-1640培地を使用して5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃で培養したものである。ジャーカット、モルト4及びナルム6の3種の白血病株化細胞を、それぞれ3.0×10<sup>6</sup>個/ml含む細胞溶液100μlに、100μmol/リットル濃度のアブリンa溶液10μlをそれぞれ添加し、5%CO<sub>2</sub>雰囲気下、37℃にて1時間ないし3時間培養したのち、2000rpmにて2分間遠心分離を行い、アポトーシスが誘導された細胞を、それぞれ集めた。

【0016】次に、各細胞を、2.5ミリmol/リットル濃度のCaCl<sub>2</sub>を含むリン酸塩緩衝生理的食塩水で穏やかにピペッティングすることにより洗浄したのち、2000rpmで2分間遠心分離して細胞を集めた。この操作を2回繰り返したのち、各細胞にFITC-アネキシンV溶液10μlを添加し、室温で10分間インキュベートした。反応終了後、2.5ミリmol/リットル濃度のCaCl<sub>2</sub>を含むリン酸塩緩衝生理的食塩水で穏やかにピペッティングすることにより洗浄したのち、2000rpmで2分間遠心分離して細胞を集めた。この操作を2回繰り返すことにより、未反応のFITC-アネキシンVを除いた。

【0017】次いで、各細胞を2.5ミリmol/リットル濃度のCaCl<sub>2</sub>を含むリン酸塩緩衝生理的食塩水に懸濁したのち、96穴マイクロプレートに移し、BIO-RAD Fluoromark Microplate Fluorometer (バイオラッド社製) を用い、励起波長488nmにおいて、535nmの蛍光強度を測定した。図1に、アポトーシス誘導時間と蛍光強度との関係をグラフ (黒丸印) で示す。図1において、(A) はジャーカット細胞、(B) モルト4細胞、(C) はナルム6細胞の場合である。

## 【0018】比較例

ジャーカット、モルト4及びナルム6の3種の白血病株

化細胞を、それぞれ実施例と同様に処理して、アポトーシスを誘導させた。以下、実施例において、 $\text{CaCl}_2$ を含むリン酸塩緩衝生理的食塩水を用いるところを、すべて $\text{CaCl}_2$ を含まないリン酸塩緩衝生理的食塩水を用いた以外は、実施例と同様にして、上記のアポトーシスが誘導された3種の細胞を処理し、励起波長488nmにおける535nmの蛍光強度を測定した。その結果を、ジャーカット細胞、モルト4細胞及びナルム6細胞について、それぞれ図1の(A)、(B)及び(C)にグラフ(白丸印)で示す。

#### 【0019】参考例

実施例において、ジャーカット、モルト4及びナルム6の3種の白血病株化細胞溶液100 $\mu$ lに、それぞれアブリンa溶液10 $\mu$ lを添加する代わりに、リン酸塩緩衝生理的食塩水10 $\mu$ lを添加した以外は、同様に処理し、アポトーシスが誘導されていない各細胞を得た。以下、実施例において、 $\text{CaCl}_2$ を含むリン酸塩緩衝生理的食塩水を用いるところを、すべて $\text{CaCl}_2$ を含まないリン酸塩緩衝生理的食塩水を用いた以外は、実施例と同様にして、上記のアポトーシスが誘導されていない3種の細胞を処理し、励起波長488nmにおける535nmの蛍光強度を測定した。その結果を、ジャーカット細胞、モルト4細胞及びナルム6細胞について、それぞれ図1の(A)、(B)及び(C)にグラフ(三角印)で示す。

【0020】図1(A)から分かるように、ジャーカット細胞は、アブリンaでアポトーシスを誘導後、カルシウムイオンの存在下でFITC-アネキシンVと反応させた場合(実施例)、誘導時間が長いほど蛍光強度が増加している。これに対し、カルシウムイオンが存在しない状態でアポトーシスが誘導されたジャーカット細胞とFITC-アネキシンVを反応させた場合(比較例)は、リン酸塩緩衝生理的食塩水の存在下で培養し、アポトーシスを誘導していない場合(参考例)と同様に、蛍光強度の変化は全く認められない。これは、実施例では

アポトーシスが誘導されてジャーカットの細胞膜表面に露出したホスファチジルセリンがFITC-アネキシンVと結合したことを示している。

【0021】また、図1(B)から分かるように、モルト4細胞は、ジャーカット細胞と同様にアブリンaによるアポトーシス誘導後、カルシウムイオン存在下でFITC-アネキシンVと反応する。しかし、3時間誘導では、1時間誘導に比べて若干反応性が低下しているが、これは、モルト4細胞の場合、ジャーカット細胞よりアポトーシスが速く進み、その結果細胞膜の形態変化が早く起こったことによるものと推察される(実施例)。これに対し、比較例及び参考例では、前記ジャーカット細胞の場合と同様に、蛍光強度の変化は全く認められない。

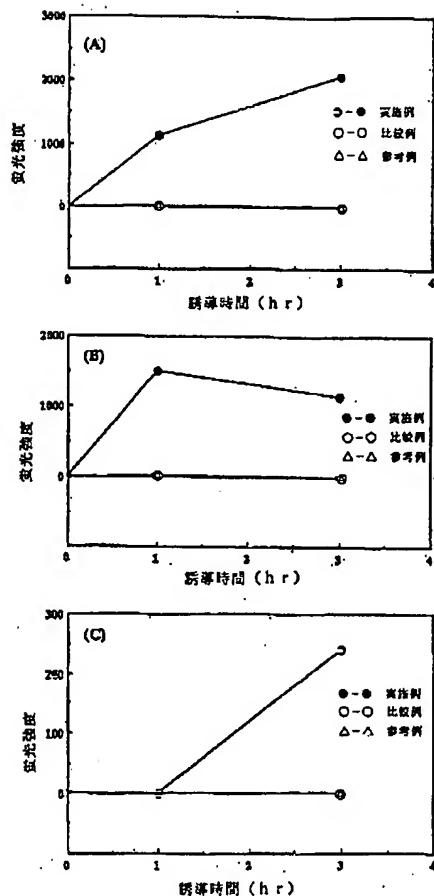
【0022】さらに、図1(C)から分かるように、ナルム6細胞は、前記他の2つの細胞と同様に、アポトーシスが誘導された場合、カルシウムイオンの存在下でFITC-アネキシンVと反応したが、その蛍光強度は低い。これは、ナルム6細胞は、ジャーカット細胞及びモルト4細胞に比べて、アブリンaによるアポトーシス誘導の感受性が低いことに起因するものと推察される(実施例)。これに対し、比較例及び参考例では、前記ジャーカット細胞及びモルト4細胞の場合と同様に、蛍光強度の変化は全く認められない。

【0023】以上の結果、ジャーカット細胞、モルト4細胞及びナルム6細胞は、いずれもアポトーシスが誘導されるが、カルシウムイオン非存在下では、FITC-アネキシンVと反応しないこと、また、細胞の種類や誘導時間によって、FITC-アネキシンVの反応性に違いがみられることが明らかとなった。これらのことから、本発明方法を用いることにより、アポトーシスの初期過程を容易に定量しうることが分かる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例、比較例及び参考例における各白血病株化細胞の誘導時間と蛍光強度との関係を示すグラフ。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成11年10月29日(1999. 10. 29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検細胞にフルオロセインイソチオシアネートで蛍光標識したアネキシンV溶液を加え、カルシウムイオンの存在下でインキュベート処理したのち、該細胞の535nm近傍の波長における蛍光強度を測定し、被検細胞のアポトーシス誘導前の蛍光強度からの増加量に基づいてアポトーシスの定量化を行うことを特徴とするアポトーシスの定量化方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0004

【補正方法】変更

【補正内容】

【0004】このアポトーシスは、その初期過程において、細胞を構成する細胞膜リン脂質の配列変化を伴い、結果として負電荷のリン脂質であるホスファチジルセリン(phosphatidylserine)の細胞表面への露出が起こる。このようなホスファチジルセリンの細胞表面への発現は、アポトーシス細胞のマクロファージ(macrophage、大食細胞)による認識と排除において、非常に重要な意味をもっている。このようなアポトーシスの初期過程の検出については、従来、アネキシンV標識体を用いて、フローサイトメトリー(flow cytometry)と呼ばれる特殊な検出器により行われている。なお、上記アネキシンVは抗凝血タンパク質であって、カルシウムイオン依存的に前記負電荷のホスファチジルセリンと特異的に結合する性

質を有することが知られている。しかしながら、このフローサイトメトリーによる方法は、単にアポトーシスが起っていることを定性的に検知することは簡単にできるが、アポトーシス誘導された細胞を定量的に測定するには非常に煩雑で長時間を要する手順を必要とするため、誰もが簡単に実施しうるものではなかった。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、細胞のアポトーシスの初期過程を定量しうる簡便な方法について鋭意研究を重ねた結果、被検細胞に特定の物質で蛍光標識したアネキシンV溶液を加え、カルシウムイオンの存在下でインキュベート処理したのち、該細胞のアポトーシス誘導前の蛍光強度を基準として蛍光強度の増加量を測定することにより、前記目的を達成しうることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】すなわち、本発明は、被検細胞にフルオロセインイソチオシアネートで蛍光標識したアネキシンV溶液を加え、カルシウムイオンの存在下でインキュベート処理したのち、該細胞の535nm近傍の波長におけ

る蛍光強度を測定し、被検細胞のアポトーシス誘導前の蛍光強度からの増加量に基づいてアポトーシスの定量化を行うことを特徴とするアポトーシスの定量方法を提供するものである。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】本発明方法においては、被検細胞に、まず前記FITC-アネキシンV溶液を添加し、カルシウムイオンの存在下でインキュベート処理する。このインキュベート処理は、通常、室温にて1～60分間程度行われる。被検細胞において、アポトーシスが誘導され、細胞膜表面にホスファチジルセリンが露出していれば、上記インキュベート処理によって、FITC-アネキシンVが該ホスファチジルセリンと結合する。したがって、細胞の蛍光強度を測定することにより、アポトーシス、特にアポトーシスの初期過程を定量することができる。上記の蛍光強度は、適当な励起波長域の光を照射し、その際発生する535nm近傍の蛍光強度を測定し、図1(A)、(B)、(C)に示すように、アポトーシス誘導前の蛍光強度を基準として、すなわち0として相対的な増加量を求めればよい。前記インキュベート処理において、カルシウムイオンが存在しない場合には、FITC-アネキシンVは細胞膜表面のホスファチジルセリンと結合しないため、アポトーシスを定量することができず、本発明の目的が達せられない。

フロントページの続き

(72)発明者 シャライ・イムレ

佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 九州工業技術研究所内

(72)発明者 朴 晟秀

佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 九州工業技術研究所内

(72)発明者 墨 利久

佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 九州工業技術研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB02 BB20

CB01 CB02 FA29 FB12 GC15

4B063 QA01 QA05 QQ08 QR41 QR48

QR50 QR66 QS03 QS36 QX02